Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Virologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Peter Naumann)

Enzym-Immuno-Assays bei Listeriose
Antigen- und Antikörpernachweis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Sabine Meyer

1981

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0093

Aus dem Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Virologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Peter Naumann)

Enzym-Immuno-Assays bei Listeriose
Antigen- und Antikörpernachweis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sabine Meyer

1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Gunther Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Helmut Brunner

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ludwig Grün

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Brunner für die Bereitstellung des Themas und der notwendigen Arbeitsmaterialien, vor allem aber für seine freundliche Beratung und Unterstützung jederzeit während der Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen der immunologischen Laboratorien, in denen ich den experimentellen Teil meiner Arbeit durchführte, danke ich für die gute kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Hohlweck danke ich für die Reproduktion der Abbildungen.

Inhalt

1. Einleitung

2. Materialien und Methoden
   2.1. Gebräuchliche Techniken des Enzym-Immuno-Assays (EIA)
      2.1.1. Antikörpernachweis
      2.1.2. Sandwich-EIA zum Antigennachweis
      2.1.3. Kompetitiver EIA zum Antigennachweis
      2.1.4. Adsorptionstest
   2.2. Wichtige Variablen und Störfaktoren des EIA
      2.2.2. Unspezifische Bindungen der Reaktionspartner untereinander
      2.2.3. Enzymmarkierung
      2.2.4. Testoptimierung
   2.3. Einzelheiten des Testsystems am Beispiel der Untersuchung von Kaninchenseren auf Antikörper gegen Listeria monocytogenes
      2.3.1. Testablauf
         2.3.1.1. Beschichtung der Mikrotiterplatten (Festphase)
         2.3.1.2. Inkubation mit Testserum
         2.3.1.3. Inkubation mit Phosphatase-markiertem Antiserum (Konjugat)
         2.3.1.4. Enzym-Substrat-Reaktion
      2.3.2. Konjugatherstellung
      2.3.3. Konjugataustestung
      2.3.4. Verwendete Materialien und Reagenzien

3. Durchführung
   3.1. Studie über den Titeranstieg der Antikörper gegen Listeria monocytogenes im Serum von Kaninchen nach Immunisierung
      3.1.1. Immunisierung
      3.1.2. Entnahme der Seren
      3.1.3. Untersuchung der Seren

3.2. Nachweis von Antikörpern gegen Listeria monocytogenes in menschlichen Seren
3.2.1. Herkunft der Seren
3.2.2. Bestimmung der Antikörpertiter
3.2.2.1. Antikörper im EIA
3.2.2.2. Antikörpertiter in der Röhrchenagglutination
3.3. Antigennachweis

4. Ergebnisse
4.1. Untersuchung der Kaninchenseren
4.2. Untersuchung der menschlichen Seren
4.3. Antigennachweis

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturübersicht

8. Verwendete Abkürzungen

9. Lebenslauf

1. Einleitung

Listeria monocytogenes, ein grampositives, kurzes, durch Geißeln bewegliches Stäbchen, ist ein weitverbreiteter Krankheitserreger, der viele Säugetierarten befallen kann. Beim Menschen ist die Durchseuchung hoch, klinische Manifestationen aber sind relativ selten. Am häufigsten ist dabei die Neugeborenen-Listeriose, in ihrer schwerwiegendsten Form als Granulomatosis infantiseptica. Außer Fetus und Neugeborenem sind sonst nur in ihrer Abwehr geschwächte Menschen gefährdet, z.B. Patienten, die unter Immunsuppressiva stehen. (13, 96)

Serologische Untersuchungen bei Listeriose sind bis heute problematisch. Dies liegt vor allem an den häufig vorkommenden Kreuzreaktionen (z.B. Staphylokokken und Enterokokken) (96), so daß falsch positive Ergebnisse nicht selten sind. Aus diesem Grunde ist es bisher zum sicheren Nachweis der Listeriose nötig, den Erreger anzuzüchten, was aber unter Umständen Wochen in Anspruch nehmen kann. (96)

Mit der Einführung der Enzym-Immuno-Assays (EIA), deren Prinzip unten noch beschrieben werden soll, steht neuerdings ein vielversprechender, empfindlicher und leicht zu handhabender Test zur Verfügung. (122) In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der EIA einen Beitrag zur Diagnostik der Listerien-Infektion leisten kann.

2. Materialien und Methoden

2.1. Gebräuchliche Techniken des Enzym-Immuno-Assays (EIA)

Der von Engvall und Perlmann 1971 entwickelte "Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay" (ELISA) (28) hat prinzipielle Ähnlichkeit mit den schon länger bekannten Radioimmunoassays (RIA) (122, 124). An die Stelle der radioaktiven Markierung des Antigens oder des Antikörpers tritt beim EIA die Koppelung mit einem Enzym, das anhand einer Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen wird.

Aus der Vielfalt möglicher Testsysteme seien die folgenden hier kurz im Prinzip beschrieben:

2.1.1. Antikörpernachweis (Abb. 1A)
- analog der "radioallergosorbent technique" - (124)

Das Antigen, gegen das Antikörper nachgewiesen werden sollen, wird an die Oberfläche eines Plastikröhrchens adsorbiert. Überschüssiges Antigen wird anschließend durch mehrfaches Waschen entfernt.
Im nächsten Schritt wird das Serum oder die Flüssigkeit, in der die Antikörper nachgewiesen werden sollen, in das mit Antigen beschichtete Röhrchen gefüllt und dieses inkubiert. Falls Antikörper vorhanden sind, binden sie sich spezifisch an das Festphasen-Antigen. Das Röhrchen wird wieder ausgespült, so daß nur an das Antigen gebundene Antikörper zurückbleiben.
Im dritten Schritt bedient man sich Enzym-markierter Antikörper, die spezifisch gegen die Art des nachzuweisenden Antikörpers gerichtet sind. Untersucht man beispielsweise menschliche Seren, so kann man Antiseren gegen menschliches IgG benutzen. Das Röhrchen wird erneut inkubiert und danach ausgewaschen. In dem Röhrchen befindet sich dann das physikalisch ge-

bundene Antigen, daran spezifisch gebunden die Antikörper, die nachgewiesen werden sollen, und wiederum daran gebunden die Enzym-markierten Antikörper. Dem Enzym wird jetzt ein Substrat zugefügt. Das Reaktionsprodukt ist farbig. Aus der Extinktionsänderung in einer bestimmten Zeit läßt.sich auf die Konzentration der gebundenen spezifischen Antikörper rückschließen.

Testsysteme dieser Art sind bisher unter anderem zum Nachweis von Antikörpern gegen folgende Antigene ausgearbeitet worden:

Bakterien und Bakterientoxine

1. Chlamydien (63)
2. Escherichia coli (Enterotoxin und O- und K-Antigene) (49)
3. Klebsiella pneumoniae (Kapsel-Polysaccharide) (86)
4. Legionella pneumophila (32)
5. Mycoplasma pulmonis (50)
6. Neisseria gonorrhoeae (Membrankomplex-Antigene) (16)
7. Rickettsien (R. quintana (45), R. prowazekii (41), R. tsutsugamushi (23) und R. typhi (41))
8. Salmonellen (O-Antigene) (19, 207
9. Tetanustoxoid (100)
10. Treponema pallidum (112)
11. Vibrio enterocolitica (38)
12. Aktinomyceten (70)
13. Nocardia brasiliensis (70)
14. Madurella mycetomi (70)
15. Streptomyces somaliensis (70)

Viren

1. Adenoviren (Hundehepatitis) (76)
2. Cytomegalie-Virus (18, 79, 93)

3. Togaviren (Dengue) (25)
4. Epstein-Barr-Virus (39)
5. Herpes-simplex-Virus (79, 113)
6. Influenza-Virus (Influenza A und B und Parainfluenza Typ 1) (11)
7. Masern-Virus (33)
8. Mumps-Virus (61)
9. Pneumonie-Virus (bei Ratten und Mäusen) (81)
10. Pseudorabies-Virus (15)
11. Rabies-Virus (3, 105)
12. Reoviren (127)
13. Respiratory-syncytial-Virus (85)
14. Röteln-Virus (33, 79, 116)
15. Rota-Virus (36)
16. Schweine-Cholera-Virus (89)
17. Sendai-Virus (80)
18. Tick-borne-encephalitis-Virus (47)

Protozoen

1. Entamöba histolytica (12)
2. Plasmodien (P. falciparum (114, 115) und P. vivax (115))
3. Toxoplasma gondii (14, 17, 24, 120)
4. Trypanosoma cruci (117), T. rhodesiense (118) T. brucei (87, 118)

Helminthen

1. Echinococcus granulosus (14, 31)
2. Onchocerca volvulus (6)
3. Schistosoma mansoni (14, 92) und S. haematobium (92)

4. Toxocara canis (37, 91)

Serumproteine

1. γ -Globuline (102, 123)
2. Komplement (Immunkonglutinine) (44)
3. Myelom-IgG-Proteine (71)
4. leichte Ketten von Immunglobulinen (82)

Sonstige

1. α_1-Fetoprotein (7)
2. verschiedene Allergene (30)
3. Carcinoembryonales Antigen (98)
4. Desoxyribonucleinsäure (40, 69, 83)
5. Dextran (59)
6. 2,4 - Dinitrophenol (29)

In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem oben beschriebenen Prinzip ein Testsystem zum Nachweis von Antikörpern gegen O- und H-Antigene von Listeria monocytogenes ausgearbeitet.
Der Test ließ sich in dieser Form auch zum Nachweis von Listeria-Antigenen benutzen. Einzelheiten dieses Testsystems werden unten besprochen.

2.1.2. Sandwich-EIA zum Antigen-Nachweis (Abb. 1B)
- analog: "Two site immunoradiometric procedure" (124)

Auch der Nachweis von Antigen ist mit einem modifizierten EIA möglich. Die Plastikoberfläche wird dabei nicht mit Antigen sondern mit Antigen-spezifischen Antikörpern beschichtet. Die Probe, die auf ihren Antigengehalt hin untersucht werden soll, wird in einem zweiten Schritt hinzugegeben, anschlies-

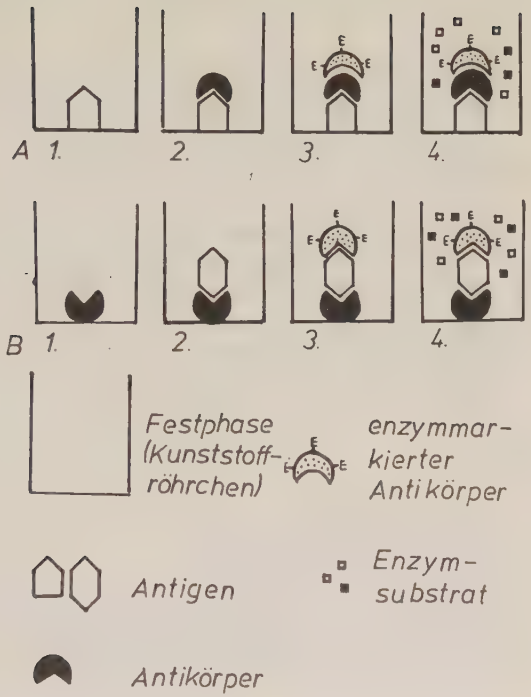


Abb. 1: Prinzip des Enzym-Immuno-Assays (nach VOLLER, A.)
A EIA zum Antikörper-Nachweis
B Sandwich-EIA zum Antigen-Nachweis

send wiederum spezifische, aber Enzym-markierte Antikörper und zum Schluß das Enzymsubstrat. In diesem Falle ist die Menge des gebildeten Farbstoffes abhängig von der Menge des vorhandenen Antigens.
Folgende Antigene sind bereits mit dieser Methode nachgewiesen worden:

Bakterien und Bakterientoxine

1. Brucellen (B. abortus, B. suis, B. melitensis und B. neotomae) (104)
2. Escherichia coli (hitzelabiles Enterotoxin) (126)
3. Legionella pneumophila (10)
4. Pseudomonas aeruginosa (94)
5. Staphylokokken Enterotoxin (90)

Viren

1. Adenoviren (43)
2. Gurken-Mosaik-Virus (35)
3. Hepatitis-A-Virus (64, 68)
4. Hepatitis-B-Oberflächen-Antigen (106, 125)
5. Herpes-simplex-Virus Typ 1 und 2 (73)
6. Maul- und Klauenseuche-Virus (22)
7. Rotavirus (27)

Myceten und Mycetentoxine

1. Aflatoxin B_1 (60)
2. Aspergillus fumigatus (84)
3. Candida albicans (121)

Sonstige

1. α_1-Fetoprotein (7, 9)
2. Choriongonadotropin (110)

3. IgG (52, 53, 54, 75)

2.1.3. Kompetitiver EIA zum Antigennachweis
- analog der klassischen RIA-Methode (124):

In dieser Testmodifikation wird Antigen mit Enzym markiert; das nachzuweisende Antigen konkurriert dann mit enzymmarkiertem Antigen um die Bindung an Festphasen-Antikörper.
Hier ist die Farbentwicklung umso schwächer, je mehr Antigen sich in der Probe befindet.
Dieser Test wurde bereits bei folgenden Antigenen angewandt:

1. α_1-Fetoprotein (8, 9)
2. α_2H-Globulin (34)
3. Angiotensin I (1)
4. Carcinoembryonales Antigen (42)
5. Choriongonadotropin (95, 108)
6. Cortisol (21)
7. Digitoxin (78)
8. Haptoglobin (72)
9. IgE (46)
10. IgG (4, 5, 28)
11. Insulin (51, 55, 57, 58, 72)
12. Östrogen (77, 107, 109)
13. Penicillin (56)
14. Placenta-Laktogen (107)
15. Progesteron (26)
16. Serumalbumin (95)
17. Staphylokokken-Enterotoxin B (99)
18. Thyreotropin (74)

2.1.4. Adsorptionstest
- analog zum immunoradiometric assay (124)

Ein Antigennachweis ist auch anhand der Fähigkeit

des Antigens, Antikörper zu neutralisieren, möglich: Man läßt Antigen-spezifische, Enzym-markierte Antikörper durch das nachzuweisende Antigen binden und inkubiert dann dieses Gemisch mit Festphasen-Antigen. Nur die noch freien Antikörper können sich an das Festphasen Antigen binden. Hier werden sie nach gründlichem Waschen mit Hilfe der Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen. Je schwächer die Enzym-Substrat-Reaktion ausfällt, desto mehr Antigen befindet sich in dem Untersuchungsmaterial.
Diese Testmodifikation wurde für Choriongonatropin (95), α_1-Fetoprotein (66) und IgG (67) ausgearbeitet (127).

2.2. Wichtige Variablen und Störfaktoren des EIA

2.2.2. Unspezifische Bindungen der Reaktionspartner untereinander

Wenn das Plastikmaterial einmal beschichtet ist, sollten keine anderen unspezifischen Bindungen an diese Festphase mehr möglich sein, da sich sonst falsch positive Reaktionen ergeben können. Wir benutzten deshalb für alle Schritte mit Ausnahme der Beschichtung und der Enzym-Substrat-Reaktion Pufferlösungen mit Detergenz und versetzten die untersuchten Seren zusätzlich mit Rinderserumalbumin. Das Rinderserumalbumin diente, gewissermaßen als neutraler Eiweißkörper dazu, etwa vorhandene Lücken in der Beschichtung zu schließen. Dadurch wurde eine unspezifische Anlagerung von Antikörpern an die Plastikoberfläche während der Seruminkubation verhindert.

2.2.3. Enzymmarkierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, ein Konjugat aus Enzym und Antikörper, bzw. Antigen herzustellen, eben-

so sind verschiedene Enzyme für diesen Zweck geeignet.
Wir benutzten alkalische Phosphatase als Enzym und für die Koppelung an Antikörper Glutardialdehyd nach der von Voller beschriebenen Methode. (119)
Als Markerenzyme werden aber auch Peroxidase, Glucoseoxidase und andere verwendet, für die Koppelung benutzt man auch Natriumperjodat, Dimaleimid und andere. (124)

2.2.4. Testoptimierung

Wenn man ein Testsystem für ein Antigen oder einen Antikörper nach einem der oben beschriebenen Modelle aufstellt, müssen zunächst alle Teilschritte optimiert werden. Dazu gehört die Ermittlung der optimalen Konjugatkonzentration, ebenso die geeignetsten Konzentrationen des Materials, mit dem die Plastikoberfläche beschichtet wird und optimale Inkubationszeiten und -temperaturen.
Eine einmal festgelegte Testmethode muß selbstverständlich streng eingehalten werden, da die Ergebnisse sonst nicht untereinander vergleichbar sind. Besonders die Enzym-Substrat-Reaktion ist zeit- und temperaturabhängig, so daß vor allem bei diesem Schritt auf exakt gleiche Inkubationsbedingungen zu achten ist. (29)
Allerdings lassen sich trotz aller Sorgfalt gewisse Schwankungen im Testausfall nicht vermeiden, so daß unbedingt bei jedem einzelnen Test positive und negative Kontrollen mitgeführt werden müssen. (111, 121)

2.3. Einzelheiten des Testsystems am Beispiel der Untersuchung von Kaninchenseren auf Antikörper gegen *Listeria monocytogenes*

2.3.1. Testablauf

Das Testprinzip ist der unter 2.1.1. beschriebene Antikörpernachweis

2.3.1.1. Beschichtung der Mikrotiterplatten (Festphase)

Wir benutzten als Antigenträger Mikrotiterplatten mit flach geformten Dellenböden (F-Form).
Zum Beschichten wurden Listeria-H- und -O-Antigene vom Typ 1 und 4b verwendet. Sie wurden in Coating-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt (siehe auch Reagenzienliste). Diese Antigenkonzentration war in Vorversuchen als optimal ermittelt worden.
In jede Vertiefung der Platte wurden 0,2 ml der Antigenverdünnung pipettiert, die Platten wurden anschließend bei 37°C über Nacht getrocknet. Diese Methode scheint für Antigene, die sich schlecht an eine Plastikoberfläche binden, geeignet zu sein. (47, 63, 76, 111)

2.3.1.2. Inkubation mit Testserum

Die getrockneten Platten wurden vor der Weiterbehandlung gewaschen. Dazu wurde gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit einem Zusatz von 0,05% Tween 20 benutzt. Die Vertiefungen der Platten wurden je dreimal mit dem Waschpuffer gefüllt, kurz stehengelassen und wieder entleert. Diese Waschvorgänge folgten nach jedem weiteren Schritt und werden im folgenden nicht mehr ausführlich beschrieben.
Die Vertiefungen wurden dann mit je 0,2 ml Serumverdünnung gefüllt. Von jeder Serumverdünnung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, ferner wurde jedesmal ein bekannt positives und negatives Kontrollserum mitgeführt. Zur Verdünnung des Serums wurde PBS mit einem Zusatz von 0,05% Tween 20 und 0,5% Rinderserumalbumin benutzt. Eine Pufferkontrolle ohne Serumzusatz war Be-

standteil jedes einzelnen Tests. (118)
Die mit Serum gefüllten Platten wurden nun mit einer Plastikfolie bedeckt und in einer feuchten Kammer drei Stunden bei +37°C inkubiert. Diese Inkubationszeiten erwiesen sich in Vorversuchen als ausreichend und ergaben die gleichen Titer wie nach Inkubation über Nacht.

2.3.1.3. Inkubation mit Phosphatase-markiertem Antiserum (Konjugat)

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Platten gewaschen und mit 0,2 ml Konjugatverdünnung pro Vertiefung beschickt. Die geeignete Konjugatverdünnung wurde in Vorversuchen ermittelt.
Die Konjugatverdünnung wurde jedesmal vor Gebrauch frisch hergestellt, da sie bei längerem Stehen einen Aktivitätsverlust zeigte, während das Konjugat-Konzentrat, bei +4°C im Dunkeln aufbewahrt, mehrere Monate stabil war (118). Die mit Konjugat beschickten Platten wurden wie oben bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde eine Inkubationszeit von zwei Stunden festgelegt.

2.3.1.4. Enzym-Substrat-Reaktion

Nach Entfernen des Konjugats und Waschen wurden 0,2 ml Substratlösung pro Delle einpipettiert. Das Substrat für unser Konjugat ist p-Nitrophenylphosphat in Diäthanolamin-Puffer (0,1%). p-Nitrophenylphosphat wird durch alkalische Phosphatase in intensiv gelb gefärbtes p-Nitrophenolat und anorganisches Phosphat gespalten. (29)
Die Substrat-Puffer-Lösung wurde vor Gebrauch frisch angesetzt und auf Raumtemperatur gebracht. Die Platten wurden mit dem Substrat exakt 30 min. stehengelassen, anschließend wurde der Inhalt jeder Delle in 1 ml 1N NaOH überpipettiert. Dies mußte so gleichmäßig gesche-

hen, daß der Inhalt jeder Delle genau 30 min. Inkubationszeit hatte. In der Natronlauge wird die Enzymreaktion sofort beendet. Die Extinktion wurde anschließend bei 405 nm photometrisch bestimmt. Im Prinzip war auch eine Beurteilung mit dem blossen Auge möglich; wir bevorzugten jedoch die photometrische Messung wegen der besseren Dokumentierbarkeit. Als Leerwert diente hierbei die Pufferkontrolle. Mit Multiscannern, d.h. Photometern, die auf die direkte Extinktionsmessung in Mikrotiterplatten eingerichtet sind, läßt sich der beschriebene Vorgang erheblich vereinfachen.
Unsere Positivkontrolle (käufliche Anti-H-, bzw. Anti-O-Listeria-Seren) zeigte bei einer Verdünnung von 1:10.000 eine gerade noch deutlich sichtbare Farbentwicklung. Wir setzten darum die Extinktion des Kontrollserums bei dieser Verdünnung als Titergrenzwert für die übrigen getesteten Seren fest. Die unvermeidlichen Schwankungen des Tests konnten auf diese Weise ausgeglichen werden.

2.3.2. Konjugatherstellung

Bei der Herstellung des Konjugats hielten wir uns genau an die Angaben von VOLLER (118).
Wir verwendeten die IgG-Fraktion eines Antiserums gegen Kaninchen-IgG von der Ziege, die wir mittels Gelfiltration, bzw. durch Fällung mit Na_2SO_4 (118) gereinigt hatten, und alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Typ Sigma VII). Zur Proteinbestimmung der gereinigten IgG-Fraktion des Antiserums verwendeten wir die Methode nach LOWRY (65).

2.3.3. Konjugataustestung

Zur Konjugataustestung wurden die Platten mit verschiedenen Verdünnungen von Kaninchenserum in Coa-

ting-Puffer beschichtet (0,2 ml Pro Delle; Inkubation über Nacht bei +4°C in der feuchten Kammer). Anschließend wurden die Platten gewaschen und dann im Sinne einer "Schachbrett-Titration" mit verschiedenen Verdünnungen des Konjugats in PBS-Tween beschickt (0,2 ml pro Delle; Inkubation drei Stunden bei +37°C in der feuchten Kammer). Nach neuerlichem Waschen wurde mit Substrat inkubiert und die Extinktion gemessen. Die kleinste Konjugatkonzentration, die noch bei 1:10.000 verdünntem Kaninchenserum eine Extinktion von 0,1 ergab, wurde als Gebrauchsverdünnung gewählt. Bei dem Anti-Kaninchen-IgG-Konjugat betrug sie 1:200 bis 1:400.

2.3.4. Verwendete Materialien und Reagenzien

1. Antigene und Antiseren
   a) Antigene von L. monocytogenes
      Listeria-Suspension für die Röhrchenagglutination
      Typ 1:H, 1:O, 4b:H, 4b:O
      Fa Behring (Marburg)
   b) Listeria-Kontrollseren
      Typ Anti-H und Anti-O
      Fa Behring (Marburg)
   c) Anti-Human-IgG (anti-γ-Kette) vom Kaninchen
      Fa Behring (Marburg)
   d) Anti-Human-IgM (anti-μ-Kette) vom Kaninchen
      Fa Behring (Marburg)
   e) Anti-Kaninchen-γ-Globulin von der Ziege
      Fa Behring (Marburg)

2. Puffer
   a) Gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

NaCl	8,0g
KH_2PO_4	0,2g
Na_2HPO_4	2,9g

KCL 0,2g
NaN_3 0,2g
Aqua dest. ad 1000,0 ml
pH 7,4; bei +4°C monatelang haltbar

b) Coating-Puffer
Na_2CO_3 1,59g
$NaHCO_3$ 2,93g
NaN_3 0,2g
Aqua dest. ad 1000,0 ml
pH 9,6; bei +4°C zwei Wochen haltbar

c) Diäthanolamin-Puffer
Diäthanolamin 97,0g
NaN_3 0,2g
$MgCl \cdot 6H_2O$ 100,0g
Aqua dest. ad 1000,0 ml
mit 1N HCl auf pH 9,8 einstellen; bei +4°C im Dunklen monatelang haltbar

3. Substrat für die Enzymreaktion
p-Nitrophenylphosphat
Fa Boehringer (Mannheim)
Unmittelbar vor Gebrauch wird das p-Nitrophenylphosphat in Diäthanolamin-Puffer aufgelöst. (1mg/ml; Raumtemperatur!)

4. Mikrotiterplatten
F-Form, aus Immunolon
Fa Greiner, Labortechnik (Nürtingen)

5. Reagenzien zur Konjugatherstellung
a) Alkalische Phosphatase
aus Kälberdarm, Typ Sigma VII
Fa Boehringer (Mannheim)

b) Glutardialdehyd
Fa Serva (Heidelberg)

c) Trispuffer
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan 0,05 Mol
Aqua dest. ad 1000,0 ml
mit HCl auf pH 8,0 einstellen

3. Durchführung

3.1. Studie über den Titeranstieg der Antikörper gegen Listeria monocytogenes im Serum von Kaninchen nach Immunisierung

3.1.1. Immunisierung

Wir immunisierten mit den O- und H-Antigenen vom Typ 1 und 4b von L. monocytogenes je zwei Kaninchen. Die Auswahl dieser vier Antigenvarianten entspricht der epidemologischen Situation in der Bundesrepublik. (97)
Jedem Kaninchen wurde zunächst eine 3 mg Gesamtprotein entsprechende Antigenmenge in physiologischer Kochsalzlösung mit Zusatz von komplettem Freund'schen Adjuvans intracutan verabreicht. Nach drei Wochen erhielt jedes Kaninchen noch einmal dieselbe Menge Antigen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans intracutan. Schließlich wurde nach weiteren drei Wochen jedem Kaninchen die gleiche Menge Antigen ohne Zusatz intraperitoneal injiziert. Die Bestimmung des Antigenproteins geschah wieder nach der Methode von LOWRY. (65)

3.1.2. Entnahme der Seren

Vor Beginn der Immunisierung und danach in wöchentlichen Abständen wurde den Kaninchen Blut entnommen und die gewonnenen Seren in kleinen Portionen eingefroren.

3.1.3. Untersuchung der Seren

Die einzelnen Seren wurden vergleichend mit dem unter 2.1.1. dargestellten EIA und der Röhrchenagglutination nach SEELIGER (96) untersucht. Als positive Kontroll-

seren für beide Tests verwendeten wir käufliche Listeria-Anti-O- und Anti-H-Kontrollseren. Als Negativkontrollseren dienten die Seren der noch nicht immunisierten Kaninchen.

3.2. Nachweis von Antikörpern gegen Listeria monocytogenes in menschlichen Seren

Wir verwendeten Seren mit bekannt positivem Ausfall der Röhrchenagglutination und solche von gesunden Personen, die in der Röhrchenagglutination keine oder höchstens ganz niedrige Titer (1:50) aufwiesen. Insgesamt untersuchten wir acht Seren mit positivem Ausfall der Röhrchenagglutination und acht Seren, die in diesem Test negativ reagierten. Bei vier Patienten aus der ersten Gruppe bestand eine durch Erregernachweis gesicherte Listeriose, in zwei Fällen lag ein klinisch begründeter Verdacht auf eine Listeriose vor (steigende Antikörpertiter), ein direkter Erregernachweis wurde jedoch nicht versucht, bei zwei Patienten erschien eine Listeriose trotz (schwach) positiven Ausfalls der Röhrchenagglutination unwahrscheinlich.

Bei den Seren Nr. 282 und 846 lagen Fehlgeburten vor. Die Mütter zeigten im Verlauf von mehreren Wochen steigende Antikörpertiter gegen L. monocytogenes in der Röhrchenagglutination.
Bei den Seren N_1 bis N_3 und 1244 wurden bei schwer geschädigten Neugeborenen Listerien mikrobiologisch nachgewiesen.
Serum 329 wurde einem achtjährigen, erheblich retardierten Kind entnommen, Serum 756 stammte von einem Neugeborenen, das wegen Krampfanfällen auffiel. Bei beiden Kindern fiel die Röhrchenagglutination nur schwach positiv aus, so daß - auch in Anbetracht des uncharakteristischen klinischen Bildes - eine Listeriose unwahrscheinlich erscheint.

3.2.2. Bestimmung der Antikörpertiter

3.2.2.1. Antikörpertiter im EIA

Für die menschlichen Seren verwendeten wir im Prinzip den unter 2.3. beschriebenen EIA mit folgenden Abwandlungen:

Als Konjugat wurde Anti-Human-IgG und Anti-Human IgM verwendet. Die entsprechenden Antiseren, aus denen das Konjugat hergestellt wurde, stammten von Kaninchen.
Aus praktischen Erwägungen wurden die mit Serum beschickten Platten drei Stunden bei 37°C und anschließend über Nacht bei +4°C in der feuchten Kammer inkubiert, ebenso die mit Konjugat beschickten Platten.
Das Anti-Human-IgM-Konjugat zeigte eine geringere Reaktionsstärke als das Anti-Human-IgG-Konjugat, so daß für das erstere eine Gebrauchsverdünnung von 1:100 gewählt wurde, und die Zeit für die Enzym-Substrat-Reaktion für die mit Anti-Human-IgM-Konjugat behandelten Platten auf eine Stunde ausgedehnt wurde.
Wir testeten ein deutlich positives und ein negatives menschliches Serum, die wir bei allen Tests als Kontrollseren mitführten.

3.2.2.2. Antikörpertiter in der Röhrchenagglutination

Alle Seren wurden zum Vergleich in der Röhrchenagglutination geprüft. In der Durchführung hielten wir uns genau an die Angaben von SEELIGER (bzw. der Herstellerfirma). (96)

3.3. Antigennachweis

Wir prüften verschiedene Enzymimmunmethoden auf ihre Eignung zum Nachweis von Listeria-Antigen. Am geeignetsten zeigte sich dabei der unter 2.1.1. beschriebene "EIA zum

Antikörpernachweis". Dieser Test läßt sich auch zum Nachweis von Antigen verwenden, wenn man die Konzentration des Antigens, mit dem die Plastikoberfläche beschichtet wird, variiert. In der Methodik hielten wir uns genau an das unter 2.3. beschriebene Schema, mit der einen Ausnahme, daß wir verschiedene Antigenverdünnungen (von 1:10 bis 1:100.000) benutzten.

Auch der Sandwich-EIA (2.1.2.) und der Adsorptionstest (2.1.4.) ermöglichten im Prinzip den Nachweis von Listeria-Antigen, erwiesen sich jedoch bei unseren Versuchen als so wenig empfindlich, daß wir diese Methoden wieder aufgaben.

4. Ergebnisse

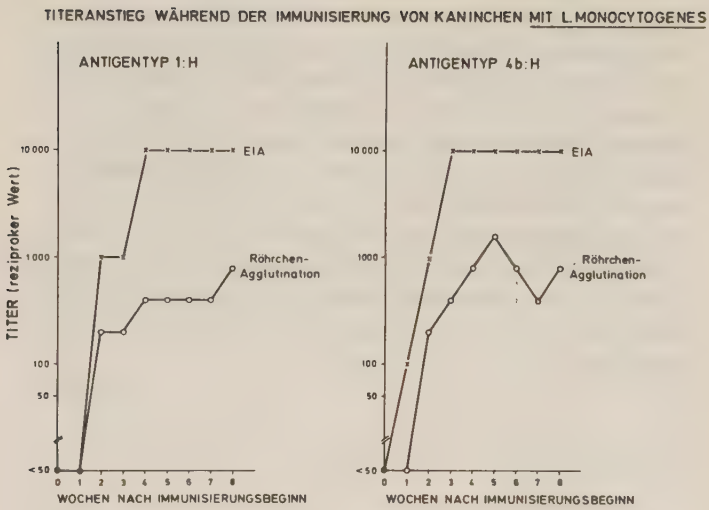
4.1. Untersuchung der Kaninchenseren (Abb.2A und 2B, Tab.1)

Alle Kaninchenseren waren vor der Immunisierung sowohl im EIA als auch in der Röhrchenagglutination nagativ. Im Laufe der Immunisierung ließ sich mit den beiden Methoden bei allen Kaninchen ein deutlicher Antikörperanstieg nachweisen. Dabei war der EIA erheblich sensibler als die Röhrchenagglutination. (Abb. 2A, B) Die O-Antigene zeigten erwartungsgemäß eine geringere Immunogenität als die H-Antigene. Daher erfolgte der Titeranstieg der Antikörper gegen O-Antigen relativ spät und war geringer als bei den H-Antigenen.

Gegen H-Antigen vom Typ 1 immunisierte Kaninchen zeigten in beiden Testmethoden etwa gleiche Antikörpertiter gegen H-Antigen vom Typ 4b und umgekehrt - was aber nicht überrascht, da beide H-Antigene in ihren Determinanten weitgehend übereinstimmen. (96)

Die mit H-Antigen immunisierten Kaninchen wiesen auch Antikörper gegen die entsprechenden O-Antigene auf. Diese erschienen jedoch relativ spät und in geringem Titer. Sie waren im EIA stärker ausgeprägt als in der Röhrchenagglutination. Der Grund lag wahrscheinlich darin, daß die verwendeten käuflichen H-Antigene noch einen Rest O-Antigen enthielten.(96) Interessant war in diesem Zusammenhang, daß die käuflichen Listeria-Kontrollseren das gleiche Verhalten zeigten. Die Seren der mit O-Antigen immunisierten Kaninchen wiesen demgegenüber keine oder nur sehr geringe Kreuzreaktionen mit H- oder O-Antigenen auf. (Tab. 1)

A



B

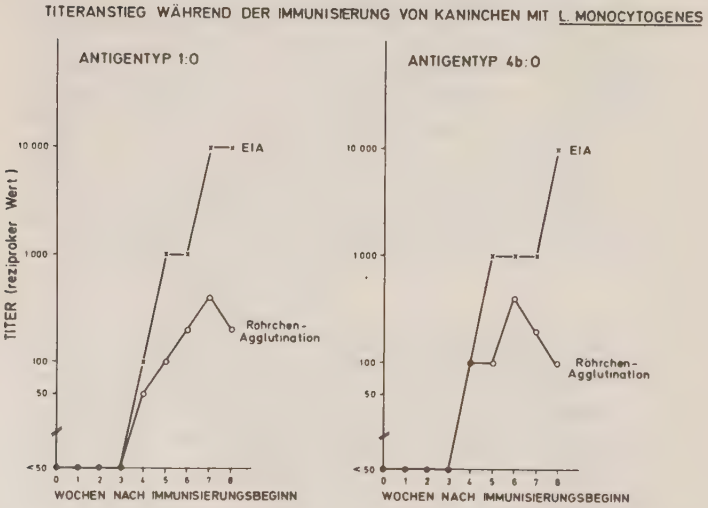


Abb. 2 A und 2 B: Titeranstieg der Antikörper gegen L. monocytogenes in den Seren von Kaninchen während der Immunisierung gegen Listeria-H-Antigene vom Typ 1 und 4b (Abb 2A) und gegen Listeria-O-Antigene vom Typ 1 und 4b (Abb. 2B)

Serum	immun. gegen	Test	Anti-gen	Wochen nach Immunisierungsbeginn 0	1	2	3	4	5	6	7	8
15	1 : H	EIA	1 : H	-	-	1.000	1.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
			4b : H	-	-	1.000	1.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
			1 : O	-	-	-	-	100	100	100	100	100
			4b : O	-	-	-	-	-	100	100	100	-
15	1 : H	RA	1 : H	-	-	200	200	400	400	400	400	800
			4b : H	-	-	200	400	800	1.600	1.600	1.600	800
			1 : O	-	-	-	-	-	-	100	200	200
			4b : O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1 : H	EIA	1 : H	-	-	1.000	1.000	1.000	10.000	1.000	1.000	10.000
			4b : H	-	-	1.000	1.000	1.000	10.000	1.000	1.000	1.000
			1 : O	-	-	-	-	100	100	100	100	-
			4b : O	-	-	-	-	100	100	100	100	100
17	1 : H	RA	1 : O	-	-	100	200	200	800	800	400	800
			4b : H	-	-	200	400	200	1.600	800	800	1.600
			1 : O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	4bH	EIA	1 : H	-	100	1.000	1.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
			4b : H	-	100	1.000	1.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
			1 : O	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	100	100
			4b : O	-	-	-	-	100	1.000	100	10.000	1.000
16	4bH	RA	1 : H	-	-	200	400	800	800	800	400	800
			4b : H	-	-	200	400	800	1.600	800	800	1.600
			1 : O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : O	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 1
Kreuzreaktionen: Antikörpertiter (reziproker Wert) von immunisierten Kaninchen gegen versch. Antigentypen

Serum	immun. gegen	Test	Anti-gen	Wochen nach Immunisierungsbeginn 0	1	2	3	4	5	6	7	8
18	4bH	EIA	1 : H	-	-	100	1.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
			4b : H	-	-	100	1.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
			1 : O	-	-	-	-	1.000	1.000	1.000	100	100
			4b : O	-	-	-	-	100	1.000	100	1.000	1.000
18	4bH	RA	1 : H	-	-	-	100	200	400	400	400	400
			4b : H	-	-	-	100	200	400	800	800	400
			1 : O	-	-	-	-	-	-	-	50	-
			4b : O	-	-	-	-	-	100	400	100	50
20	4b : O	EIA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	100	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : O	-	-	-	-	-	-	-	100	-
			4b : O	-	-	-	-	100	1.000	1.000	1.000	10.000
20	4b : O	RA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : O	-	-	-	-	50	-	-	-	-
			4b : O	-	-	-	-	100	100	400	200	100
21	4b : O	EIA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : O	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : O	-	-	-	-	-	100	100	1.000	1.000
21	4b : O	RA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : O	-	-	-	-	50	-	-	100	-
			4b : O	-	-	-	-	50	100	200	100	50

Serum	immun. gegen	Test	Antigen	Wochen nach Immunisierungsbeginn 0	1	2	3	4	5	6	7	8
19	1 : 0	EIA	1 : H	-	-	-	-	-	-	100	100	100
			4b : H	-	-	-	-	-	-	100	100	-
			1 : 0	-	-	-	-	100	100	1.000	1.000	10.000
			4b : 0	-	-	-	-	-	-	-	100	100
19	1 : 0	RA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : 0	-	-	-	-	-	-	100	100	100
			4b : 0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	1 : 0	EIA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : 0	-	-	-	-	100	1.000	1.000	10.000	10.000
			4b : 0	-	-	-	-	-	-	-	100	-
22	1 : 0	RA	1 : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			4b : H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			1 : 0	-	-	-	-	50	100	200	400	200
			4b : 0	-	-	-	-	-	-	200	-	-

Tab.1: Kreuzreaktionen Antikörpertiter (reziproker Wert) von immunisierten Kaninchen gegen verschiedene Antigentypen

"-" bedeutet beim EIA: Titer < 1:100

bei der Röhrchenagglutination (RA): Titer < 1: 50

4.2. Untersuchung der menschlichen Seren (Abb.3, Tab.2)

In den nachfolgenden Tabellen sind die mit den verschiedenen Tests ermittelten Antikörpertiter vergleichend dargestellt.
Es fiel auf, daß mit dem EIA für IgG-Antikörper auch in den Seren von Gesunden häufig Antikörper gegen Listerien nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse des EIA für IgM-Antikörper entsprechen demgegenüber besser denen der Röhrchenagglutination und auch den klinischen Daten. (Tab. 2) Besonders interessant war in diesem Zusammenhang der Antikörperanstieg bei einer Patientin (N), die besonders hohe Titer in der Röhrchenagglutination aufwies und der im Laufe von vier Monaten wiederholt Blutproben entnommen wurden. (Abb.3) Hier lag eine Listeriose in der Schwangerschaft vor, die zu einer Fehlgeburt führte. Die Antikörpertiter in der Röhrcheagglutination sanken bei dieser Patientin im Laufe der Zeit allmählich ab, ebenso verhielten sich die Antikörpertiter im EIA für IgM-Antikörper. Die IgG-Antikörper dagegen, die im EIA nachgewiesen wurden, stiegen weiter an. Dieses Verhalten entspricht der bekannten Tatsache, daß im allgemeinen die Bildung von IgM-Antikörpern nach einer Erstinfektion rascher einsetzt, aber auch schneller wieder abklingt als die von IgG. (2) Das Verhältnis von IgM- zu IgG-Antikörpern ließ also einen gewissen Rückschluß auf den Zeitpunkt der zurückliegenden Infektion zu.

4.3. Antigennachweis (Abb. 4)

Es gelang uns, mit der beschriebenen EIA-Methode formalinisierte Listeria-H-Antigene bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 nachzuweisen. Diese entspricht nach Angaben der Hersteller einer Konzentration von $6 \cdot 10^5$ Keimen/ml oder nach unseren Messungen einer Konzentration des Antigen-Proteins von 0,3 µg/ml.

Die für die verschiedenen Serum- und Antigenkonzentrationen ermittelten Extinktionen sind in Abb. 4 festgehalten. Bei Antigenverdünnungen über 1:10.000 hinaus näherten sich die Extinktionen denen der Kontrolle und ließen sich wegen größerer Schwänkungen innerhalb der Dreifachbestimmungen nicht mehr auswerten.

Tabelle 2 A
Antikörpertiter bei menschlichen Seren (reziproker Wert)
bei gesicherter Listeriose und Listeriose-Verdacht

Serum-Nr.	Test-anti gen	Test			Anamnese
		Röhr-chen-aggl.	EIA f. IgM	EIA f. IgG	
N_1	1:H	12.800	1.600	-	Schwangeren-Listeriose, die zu einer Fehlgeburt führte. Serumentnahme 1, 5 und 15 Wochen nach Feststellung der Listeriose bei der Mutter. (N_1, N_2 und N_3)
	1:0	-	-	-	
	4b:H	12.800	3.200	-	
	4b:0	1.600	200	6.400	
N_2	1:H	3.200	1.600	800	
	1:0	-	200	-	
	4b:H	1.600	3.200	800	
	4b:0	25.600	400	800	
N_3	1:H	200	400	800	
	1:0	-	100	100	
	4b:H	200	400	800	
	4b:0	200	200	1.600	
1244	1:H	-	-	400	Schwere Neugeborenen-Listeriose. Mikrobiologischer Erregernachweis.
	1:0	-	-	400	
	4b:H	-	-	200	
	4b:0	400	200	400	
846	1:H	-	-	100	Fehlgeburten. Steigende Antikörpertiter bei den Müttern gegen L. monocytogenes im Verlauf mehrerer Wochen in der Röhrchenagglutination
	1:0	-	-	-	
	4b:H	-	-	100	
	4b:0	400	100	200	
282	1:H	-	100	200	
	1:0	-	200	200	
	4b:H	-	100	200	
	4b:0	1.600	400	200	
329	1:H	-	100	100	Nicht bestätigter Verdacht auf Listeriose. 329: Krämpfe in der Neugeborenenperiode; 756: Achtjähriges, erheblich retardiertes Kind
	1:0	200	100	-	
	4b:H	100	100	-	
	4b:0	-	-	-	
756	1:H	-	-	100	
	1:0	100	100	-	
	4b:H	-	-	-	
	4b:0	-	-	-	

"-" bedeutet: Titer kleiner als 100

Tabelle 2 B

Antikörpertiter bei menschlichen Seren (reziproker Wert) bei gesunden Personen

Serum-Nr.	Test-antigen	Test		
		Röhrchen-aggl.	EIA f. IgM	EIA f. IgG
124	1:h	-	-	-
	1:0	-	-	-
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-
126	1:H	-	-	200
	1:0	-	-	400
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	200
152	1:H	-	-	400
	1:0	-	-	400
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-
153	1:H	-	-	-
	1:0	-	-	-
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-
131	1:H	-	-	-
	1:0	-	-	-
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-
132	1:H	-	-	-
	1:0	-	-	200
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-
133	1:H	-	-	200
	1:0	-	-	200
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-
134	1:H	-	-	-
	1:0	-	-	200
	4b:H	-	-	-
	4b:0	-	-	-

"-" bedeutet: Titer kleiner als 100

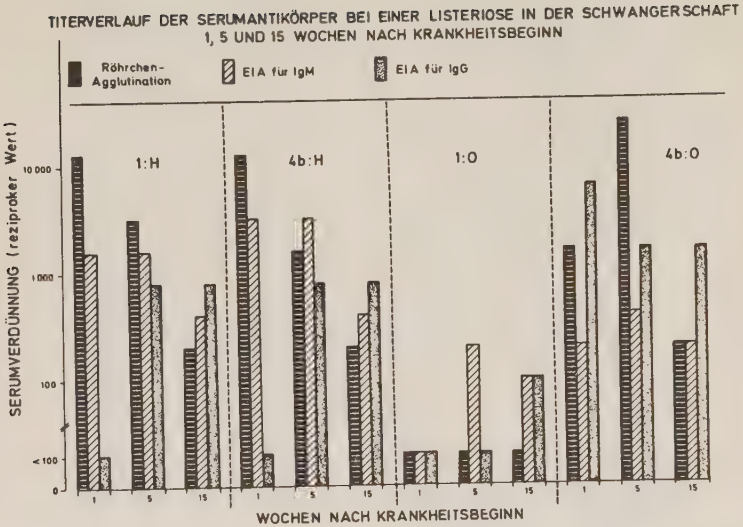


Abb. 3: Titerverlauf der Serumantikörper bei einer Listeriose in der Schwangerschaft 1, 5 und 15 Wochen nach Krankheitsbeginn

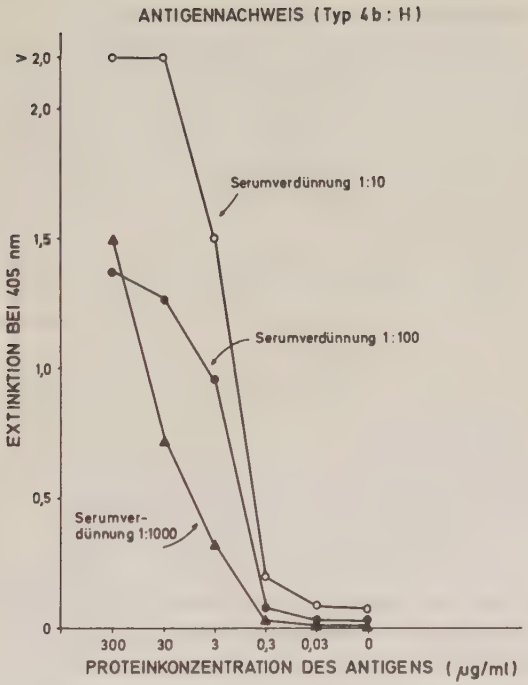


Abb. 4: Antigennachweis bei verschiedenen Proteinkonzentrationen des Antigens und bei verschiedenen Testvariationen (Serumverdünnung 1:10, 1:100 und 1:1.000)

5. Diskussion

Anhand unserer Untersuchungen an immunisierten Kaninchen wurde gezeigt, daß ein Nachweis von Antikörpern gegen Listeria-Antigen mit der EIA - Methode möglich war. Die Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der Röhrchenagglutination war gut. Die häufig zu beobachtenden Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Antigentypen ist zum größten Teil auf gemeinsame Antigen-Determinanten zurückzuführen. Eine stärkere Reinigung der Antigene würde daher die Spezifität des Tests erhöhen.
Die Vorteile der EIA-Technik gegenüber der Röhrchenagglutination liegen in ihrer höheren Sensibilität und in der Einfachheit ihrer Durchführung. Die Notwendigkeit, Kontrollseren mitzuführen, besteht sowohl bei der Röhrchenagglutination, als auch beim EIA. Der Arbeitsaufwand für den EIA ist dem für die Röhrchenagglutination etwa gleich. Wegen der geringen Antigenmengen, die pro Test beim EIA benötigt werden, ist der Test verhältnismäßig preiswert.
Die Studie an menschlichen Seren läßt den EIA mit der Möglichkeit, nach Immunglobulinklassen zu differenzieren, sehr vielversprechend erscheinen. Bei unklaren Ergebnissen der Röhrchenagglutination (Titer im Grenzbereich) läßt sich beispielsweise mit dem EIA eine Aussage darüber machen, ob es sich um eine frische oder zurückliegende Infektion handelt. Da die serologische Untersuchung auf Listeriose mit zu den Vorsorgeuntersuchungen für Schwangere gehört, könnte der EIA hier einige Bedeutung bekommen. Allerdings sind weitere Untersuchungen notwendig, um eine definitive Aussage über die klinische Anwendbarkeit des Tests machen zu können.
Von besonderer Wichtigkeit ist in unseren Augen der Antigennachweis, denn nur er erlaubt bisher die wirklich sichere Diagnose einer Listeriose.(96). In schwie-

rigen Fällen, in denen der Keim in der Kälte angereichert werden muß, um anschließend angezüchtet werden zu können, nimmt der Erregernachweis erhebliche Zeit in Anspruch. (96)
Mit Hilfe der EIA-Methode kann der Nachweis von Listeria-Antigen innerhalb von zwei Tagen erbracht werden; allerdings muß noch geprüft werden, ob die Empfindlichkeit der Methode für die Praxis ausreicht. Da die Kreuzreaktionen zwischen Listerien und anderen Bakterien die O-Antigene betreffen, wir aber für den Antigennachweis die spezifischeren H-Antigene benutzten, ist zu erwarten, daß die Spezifität der Methode ausreichend ist. Selbstverständlich muß auch dies an mehr Untersuchungsmaterial überprüft werden.

6. Zusammenfassung

Der EIA ist ein relativ neuer serologischer Test, der in der klinischen Bakteriologie noch kaum verwendet wird. Wir haben zunächst seine Anwendung zum Nachweis von Antikörpern gegen L. monocytogenes untersucht und mit der Röhrchenagglutination verglichen. Kaninchen, die mit den in der Bundesrepublik am häufigsten vorkommenden Listeria-Antigenen 1 und 4b immunisiert worden waren, zeigten sowohl im EIA als auch in der Röhrchenagglutination einen deutlichen Titeranstieg der Serumantikörper. Der EIA erwies sich dabei als wesentlich sensibler als die Röhrchenagglutination.
Bei der Untersuchung menschlicher Seren zeigte sich, daß der EIA eine sinnvolle Ergänzung zur Röhrchenagglutination bieten könnte, da er eine Unterscheidung der nachgewiesenen Antikörper hinsichtlich ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen Immunglobulinklassen zuläßt. Damit ermöglicht er eine Aussage über den Verlauf einer Infektion.

Nach Modifizierung der Methode ließen sich auch Listeria-Antigene nachweisen, wobei 0,3μg Antigenprotein/ml zum Nachweis ausreichten.
Unserer Ansicht nach ist der EIA für die Listeriose-Diagnostik eine vielversprechende Alternative; wichtiger als die Titerbestimmung erscheint uns dabei der Antigennachweis. Die klinische Erprobung der erarbeiteten Tests steht noch aus.

7. Literaturübersicht

1. Aikawa, T. et al.

   Enzyme immunoassay of angiotensin I
   Endocrinology 105 (1979)

2. Ambrosius, H. und Rudolph, N.

   Grundriß der Immunbiologie
   Gustav Fischer Verlag, Jena, 206-207 (1978)

3. Atanasiu, P. et al.

   Rapid immunoenzymatic technique for titration of rabies antibodies, IgG and IgM results
   Med. Microbiol. Immunol. (Berl.) 166, 201 (1978)

4. Avrameas, S. und Guilbert, B.

   Dosage enzymo-immunologique de protéines à l'aide d'immunoadsorbents et d'antigènes marqués aux enzymes
   C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D 273, 2705 (1971)

5. Avrameas, S. und Guilbert, B.

   Enzyme immunoassay for the measurement of antigens using peroxidase conjugates
   Biochimie 54, 837 (1972)

6. Bartlett, A. et al.

   Preliminary studies of the application of enzyme immunoassay in the detection of antibodies in onchocerciasis
   Tropenmed. Parasitol. 26, 370 (1975)

7. Belanger, L. und Dufour, D.

   Le dosage immunoenzymologique de l'AFP
   In L'Alpha-foeto-proteine. R. Masseyeff, Ed. Institut National de la Sante & de la Recherche Médicale, Paris, Frankreich, 533 (1974)

8. Belanger, L. et al.

   Doubleantibody enzyme immunoassay applied to human α_1-fetoprotein

   Clin. Chem. 22, 198 (1976)

9. Belanger, L. et al.

   Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures
   Clin. Chim. Acta 48, 15 (1973)

10. Berdal, B. P. et al.

    Detection of Legionella pneumophila antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay
    J. Clin. Microbiol. 9, 575 (1979)

11. Bishai, F. R. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients
J. Clin. Microbiol. 8, 648 (1978)

12. Bos, H. J. et al.

Application of ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay - in the serodiagnosis of amoebiasis
Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. 69, 440 (1975)

13. Bösel, B. und Hartung, K.

Praktikum des Infektions- und Impfschutzes
Verlag Hildegard Hoffamnn, Berlin, 173-176 (1975)

14. Bout, D. et al.

Le diagnostic immonoenzymologique des affections parasitaires. II. Immunoenzymologie quantitative (E.L.I.S.A.)
Lille Med. 20, 561 (1975)

15. Briaire, J. et al.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody against Aujeszky's disease virus in pig sera
Zentralbl. Veterinaermed. (B) 26, 76 (1979)

16. Brodeur, B. R. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of Neisseria gonorrhoeae specific antibodies
Can. J. Microbiol. 24, 1300 (1978)

17. Camargo, M. E. et al.

Immunoglobulin G and Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns
Infect. Immun. 21, 55 (1978)

18. Cappel, R. et al.

Rapid detection of IgG and IgM antibodies for cytomegalovirus by the enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA)
Arch. Virol. 58, 253 (1978)

19. Carlsson, H. E. et al.

Titration of antibodies to Salmonella O antigens by enzyme-linked immunosorbent assay
Infect. Immun. 6, 703 (1972)

20. Carlsson, H. E. et al.

Quantitation of Salmonella O-antibodies in human sera by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 48, 485 (1975)

21. Comoglio, S. und Celada, F.

An immuno-enzymatic assay of cortisol using E. coli ß-galactosidase as label
J. Immunol. Methods 10, 161 (1976)

22. Crowther, J. R. et al.

Detection and Quantification of foot and mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay techniques
J. Gen. Virol. 42, 597 (1979)

23. Dasch, G. A. et al.

Sensitive microplate enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against the scrub typhus rickettsia, Rickettsia tsutsugamushi
J. clin. Microbiol. 9, 38 (1979)

24. Denmark, J. R. et al.

Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the detection of Toxoplasma antibody
Med. Lab. Sci. 35, 227 (1978)

25. Dittmar, D. et al.

Immunoglobulin G- and M-specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dengue antibodies
J. Clin. Microbiol. 9, 498 (1979)

26. Dray, F. et al.

Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using ß-galactosidase as label
Biochim. Biophys. Acta 403, 131 (1975)

27. Ellens, D. J. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves
J. Clin. Microbiol. 6, 530 (1977)

28. Engvall, E. und Perlmann, P.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G
Immunochemistry 8, 871 (1971)

29. Engvall, E. und Perlamm, P.

Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzame-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes
J. Immunol. 109, 129 (1972)

30. Eriksson, N. E. et al.

Diagnosis of reaginic allergy with house dust, animal dander and pollen allergens in adult patients. V.A. comparison between the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), provocation tests, skin tests and RAST
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 54, 88 (1977)

31. Farag, H. et al.

Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Biomedicine 23, 276 (1975)

32. Farshy, C. E. et al.

Detections of antibodies to legionnaires disease organism by microagglutination and micro-enzyme-linked immunosorbent assay tests
J. Clin. Microbiol. 7, 327 (1978)

33. Forghani, B. et al.

Antigen requirements, sensitivity, and specificity of enzyme immunoassays for measles and rubella viral antibodies
J. Clin. Microbiol. 9, 657 (1979)

34. Fuccaro-Decaens, C. et al.

Étude comparative de deux techniques sensibles de dosage immunologique, appliqués àla détection de l'α_2H-globuline sérique
Ann. Immunol. (Paris) 125C, 747 (1974)

35. Gera, A. et al.

Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay
Virology 86, 542 (1978)

36. Ghose, L. H. et al.

Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of rotavirus antibodies with complement fixation in epidemiological survey
J. Clin. Microbiol. 8, 268 (1978)

37. Glickman, L. et al.

Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27, 492 (1978)

38. Granfors, K.

Measurement of immunoglobuli M (IgM), IgG, and IgA antibodies against Yersinia enterocolitica by enzyme-linked immunosorbent assay: persistence of serum antibodies during disease
J. Clin. Microbiol. 9, 336 (1979)

39. Granlund, D. J. et al.

Detection of Epstein-Barr virus antigens with enzyme-conjugated antibody
Int. J. Cancer 20, 495 (1977)

40. Gripenberg, M. et al.

A Solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the demonstration of antibodies against denatured, single-stranded DNA in patient sera
Scand. J. Immunol. 7, 151 (1978)

41. Halle, S. et al.

Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against typhus rickettsiae, Rickettsia prowazekii and Rickettsia typhi
J. Clin. Microbiol. 6, 101 (1977)

42. Hammarström, S. et al.

Nature of the tumor-associated determinant (s) of carcinoembryonic antigen
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72,1528 (1975)

43. Harmon, M. W. et al.

Detection of adenovirus by enzyme-linked immunosorbent assay
J. Clin. Microbiol. 9, 342 (1979)

44. Hautanen, A. et al.

Use of ELISA for measuring immunoconglutinins
J. Immunol. Methods 21, 335 (1978)

45. Hermann, J. E. et al.

Enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation tests for the detection of antibodies to Rochalimaea (Rickettsia) quintana
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 154, 285 (1977)

46. Hoffman, D. R.

Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
J. Allergy Clin. Immunol. 51 303 (1973)

47. Hofmann, H. et al.

Rapid diagnosis of tick-borne encephalitis by means of enzyme-linked immunosorbent assay
J. Gen. Virol. 42, 505 (1979)

48. Holmgren, J. und Svennerholm, A.-M.

Enzyme-linked immunosorbent assays for cholera serology
Infect. Immun. 7, 759 (1973)

49. Holmgren, J.

Comparison of the tissue receptors for Vibrio cholerae and Escherichia coli enterotoxins by means of gangliosids and natural cholera toxid
Infect. Immun. 8, 851 (1973)

50. Horowitz, S. A. et al.

Detection of antibodies to Mycoplasma pulmonis by an enzyme-linked immunosorbent assay
Infect. Immun. 22, 161 (1978)

51. Ishikawa, E.

Enzyme immunoassay of insulin by fluorimetry of the insulin-glucoamylase complex
J. Biochem. 73, 1319 (1973)

52. Kato, K. et al.

Enzyme-linked immunoassay. II. A simple method for synthesis of the rabbit antibody-ß-D-galactosidase complex and its general applicability
J. Biochem. 78, 423 (1975)

53. Kato, K. et al.

Enzyme-linked immunoassay. Conjugation of rabbit anti (human immunoglobulin G) antibody with ß-D-galactosidase from Escherichia coli and its use for human immunoglobulin G assay
Eur. J. Biochem. 62, 285 (1976)

54. Kato, K. et al.

Coupling Fab'fragment of rabbit anti-human IgG antibody to ß-D-galactosidase and a highly sensitive immunoassay of human IgG
FEBS Lett. 56, 370 (1975)

55. Kato, K. et al.

Enzyme-linked immunoassay. I. Novel method for synthesis of the insulin-ß-galactosidase conjugate and its applicability for insulin assay
J. Biochem. 78, 235 (1975)

56. Kitagawa, T. et al.

A new method of preparation of an antiserum to penicillin and its application for novel enzyme immunoassay of penicillin
J. Biochem., Tokyo, 84, 491 (1978)

57. Kitagawa, T. et al.

Enzyme coupled immunoassay of insulin using a novel coupling reagent
J. Biochem. 79, 233 (1976)

58. Kleinhammer, G. et al.

Determination of serum insulin by solid phase enzyme immunoassay in antibody coated tubes
Z. Anal. Chem. 279, 145 (1976)

59. Larsson, A. et al.

Destruction of dextran-coated targent cells by normal human lymphocytes and monocytes
Scand. J. Immunol. 4, 241 (1975)

60. Lawellin, D. W. et al.

Enzyme-linked immunosorbent analysis for aflatoxin B1.
Appl. Environ. Microbiol. 34, 94 (1977)

61. Leinikki, P. O. et al.

Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for mumps virus antibodies
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 363 (1979)

62. Leinikki, P. O. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay determination of specific rubella antibody levels in micrograms of immunoglobulin G per milliliter of serum in clinical samples
J. Clin. Microbiol. 8, 419 (1978)

63. Lewis, V. J. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for chlamydial antibodies
J. Clin. Microbiol. 6, 507 (1977)

64. Locarnini, S. A. et al.

Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A virus
J. Clin. Microbiol. 8, 277 (1978)

65. Lowry, O. H. et al.

Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

66. Maiolini, B. et al.

Enzymoimmunoassay of human alpha-fetoprotein
J. Immunol. Methods 6, 355 (1975)

67. Massayeff, R. et al.

A method of enzyme immunoassay
Biomedicine 19, 314 (1973)

68. Mathiesen, L. R. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A antigen in stool and antibody to hepatitis A antigen in sera: comparison with solid-phase radioimmunoassay, immune electron microscopy, and immune adherence hemaagglutination assay
J. Clin. Microbiol. 7, 184 (1978)

69. Matre, R. et al.

Human serum antibodies against native DNA detected by an indirect immunoperoxidase spot technique
J. Immunol. Methods 5, 345 (1974)

70. Mc Laren, M. L. et al.

Preliminary investigation of the use of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of mycetoma
Sabouraudia 16, 225 (1978)

71. Mellstedt, H. et al.

Monoclonal Lymphocyte population in human plasma cell myeloma
Clin. Exp. Immunol. 17, 371 (1974)

72. Miedema, K. et al.

Determinations of proteins and hormones in serum by an immunoassay using antigen-enzyme conjugates
Clin. Chim. Acta 40, 187 (1972)

73. Mills, K. W. et al.

Serotyping herpes simplex virus isolated by enzyme-linked immunosorbent assays
J. Clin. Microbiol. 7, 73 (1978)

74. Miyai, K. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay of thyrotropin
Clin. Chim. Acta 67, 263 (1976)

75. Mukojima, T. et al.

Estimation of immunoglobulin by enzyme-linked immunoenzymeassay
Chem. Abstr. 82, 363 (1975)

76. Noon, K. F. et al.

An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine antibodies to canine adenoviruses
Lab. Anim. Sci. 29, 603 (1979)

77. Numazawa, M. et al.

Picogram order enzyme immunoassay of oestradiol
FEBS Lett. 79, 396 (1977)

78. Oellerich, M. et al.

Determination of digitoxin in serum using enzyme immunotest
Internist, Berlin, 19, 188 (1978)

79. Pácsa, A. S. et al.

Detection of antibodies to cytomegalovirus, herpes simplex virus and rubellavirus with the micro-enzyme immunoassay
Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 26, 35 (1979)

80. Parker, J. C. et al.

Sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation, and hemagglutination inhibition serological tests for detection of Sendai virus antibody in laboratory mice
J. Clin. Microbiol. 9, 444 (1979)

81. Payment, P. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to pneumonia virus of mice in rat sera
Lab. Anim. Sci. 28, 676 (1978)

82. Perlmann, P. et al.

Lymphocyte mediated cytotoxicity in vitro. Induction and inhibition by humoral antibody and nature of effector cells
Transplant Rev. 13, 91 (1972)

83. Pesce, A. J. et al.

Use of enzyme-linked antibodies to measure serum anti-DNA antibody in systemic lupus erythematosus
Clin. Chem. 20, 353 (1974)

84. Richardson, M. D. et al.

Detection of circulating antigen of Aspergillus fumigatus in sera of mice and rabbits by enzyme-linked immunosorbent assay
Mycopathologica 67, 83 (1979)

85. Richardson, L. S. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of serological reponse to respiratory syncytial virus infection
Infect. Immun. 20, 660 (1978)

86. Rissing, J. P. et al.

Enzyme-linked immunospecific antibody test for detecting antibody to Klebsiella
J. Clin. Microbiol. 8, 704 (1978)

87. Ruitenberg, E. J. et al.

Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)
Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 31 (1977)

88. Ruitenberg, E. J. et al.

Serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in pigs by enzyme immunoassay
Bull. W. H. O. 51, 108 (1974)

89. Saunders, G. C. und Wilder, M. E.

Disease screening with enzyme-labeled antibodies
J. Infect. Dis. 129, 362 (1974)

90. Saunders, G. C. et al.

Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A
Appl. Environ. Microbiol. 34, 518 (1977)

91. de Savigny, D. H. et al.

Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay
J. Clin. Pathol. 32, 284 (1979)

92. Schinski, V. D. et al.

Enzyme- and 125 I-labeled anti-immunoglobulin assays in the immunodiagnosis of schistosomiasis
Am. J. Trop. Med. Hyg. 25, 824 (1976)

93. Schmitz, H. et al.

Solid-phase enzyme immunoassay for immunoglobulin M antibodies to cytomegalovirus
J. Clin. Microbiol. 5, 629 (1977)

94. Schultz, W. W. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for Pseudomonas aeruginosa exotoxin
J. Clin. Microbiol. 9, 705 (1979)

95. Schuurs, A. H. W.M. und Van Weeman, B. K.

U. S. Patent 3,654,090
(1972)

96. Seeliger, H. P. R.
Listeriose
Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, 1958

97. Sigl, H.

Differentialdiagnostische Gesichtspunkte bei der Listeriosen-Meningitis
Münch. Med. Wochenschr. 118, (49), 1601 (1976)

98. Simmons, D. A. R. und Perlmann, P.

Carcinoembryonic antigen and blood group substances
Cancer Res. 33, 313 (1973)

99. Simon, E. et al.

Detection of staphylococcus enterotoxin B using the ELISA test
Zentralbl. Veterinaermed. (B) 24, 842 (1977)

100. Stiffler-Rosenberg, G. et al.

Measurement of human tetanus antitoxin using an enzyme-linked immunosorbent assay
Schweiz. Med. Wochenschr. 107, 1101 (1977)

101. Stimson, W. H. und Sinclair, J. M.

An immunoassay for a pregnancy-associated-α-macroglobulin using antibody-enzyme conjugates
FEBS Lett. 47, 190 (1974)

102. Streefkerk, J. G. und Deelder, A. M.

Serodiagnostic application of immunohistoperoxidase reactions on antigen-coupled agarose beads
J. Immunol. Methods 7, 225 (1975)

103. Svennerholm, A.-M.

Experimental studies on cholera immunization. The antibody response to formalinized Vibrio cholerae and purified endotoxin with special reference to protective capacity
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 49, 434 (1975)

104. Thoen, C. O. et al.

Use of an enzyme immunoassay test for characterizing the A and M antigens of Brucella
J. Clin. Microbiol. 9, 485 (1979)

105. Thraenhart, O. et al.

Enzyme immunoassay for demonstration of rabies-virus antibodies after immunisation (letter)
Lancet 2, 399 (1977)

106. Ukkonen, P. et al.

Enzyme-immunoassay in the detection of hepatitis B surface antigen
J. Immunol. Methods 15, 343 (1977)

107. Van Hell, H. et al.

Pregnancy-monitoring with enzyme-immunoassays for human placental lactogan and total oestrogens
Z. Anal. Chem. 279, 143 (1976)

108. Van Weeman, B. K. und Schuurs, A. H. W. M.

Immunoassay using antigen-enzyme conjugates
FEBS Lett. 15, 232 (1971)

109. Van Weeman, B. K. und Schuurs, A. H. W. M.

Immunoassay using haptan-enzyme conjugates
FEBS Lett. 24, 77 (1972)

110. Van Weeman, B. K. und Schuurs, A. H. W. M.

Immunoassay using antibody-enzyme conjugates
FEBS Lett. 43, 215 (1974)

111. Vejitorp, M.

Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of rubella IgG antibodies
Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) 86B, 387 (1978)

112. Veldkamp, J. und Visser, A. M.

Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of syphilis
Br. J. Vener. Dis. 51, 227 (1975)

113. Vestergaard, B. F. et al.

Titration of herpes simplex virus antibodies in human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) 85B, 466 (1977)

114. Voller, A. et al.

A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria
Bull. W. H. O. 51, 209 (1974)

115. Voller, A. et al.

New serological test for malaria antibodies
Br. Med. J. i, 659 (1975)

116. Voller, A. und Bidwell, D. E.

A simple method for detecting antibodies to rubella
Br. J. Exp. Pathol. 56, 338 (1975)

117. Voller, A. et al.

Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease
Lancet i, 426 (1975)

118. Voller, A. et al.

A serological study of human Trypanosoma rhodesiense infections using a microscale enzyme-linked immunosorbent assay
Tropenmed. Parasitol. 26, 247 (1975)

119. Voller, A. et al.

Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections
Manual of clinical immunology, N. R. Rose und H. Friedman Ed. Washington DC 516-512 (1976)

120. Walls, K. W. et al.

Use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its microadaption for the serodiagnosis of toxoplasmosis
J. Clin. Microbiol. 5, 273 (1977)

121. Warren, R. C. et al.

Diagnosis of invasive candidosis by enzyme immunoassay of serum antigen
Br. Med. J. 1, 1183 (1977)

122. W.H.O. Collaborative Study

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Bull. W. H. O. 54, 129, (1976)

123. Willems, F. T. et al.

ELISA for rheumatoid factor (letter)
Lancet 1, 994 ;978)

124. Wisdom, B.

Enzyme-immunoassays
Clin. Chem. 22, 1234 (1976)

125. Wolters, G. et al.

Enzyme-immunoassay (EIA) of hepatitis B surface antigen (HB_sAg)
Z. Anal. Chem. 279, 144 (1976)

126. Yolken, R. H. et al.

Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin
J. Clin. Microbiol. 6, 439 (1977)

127. Yolken, R. H. et al.

Immunological response to infection with human reovirus-like agent: measurement of anti-human reovirus like agent immunoglobulin G and M levels by the method of enzyme-linked immunosorbent assay
Infect. Immun. 19, 540 (1978)

8. Verwendete Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin
EIA	Enzym-Immuno-Assay
Ig	Immunglobulin
L. monocytogenes	*Listeria monocytogenes*
PBS	gepufferte Kochsalzlösung
RIA	Radio-Immuno-Assay

9. Lebenslauf

Ich, Sabine Meyer, wurde am 7. Juni 1955 in Tönisvorst als Tochter der Margarete Meyer und des Dr. Carl-Heinrich Meyer geboren. Meine Mutter, geboren am 26. März 1923 war Chemielaborantin. Sie starb am 7. November 1967. Mein Vater, geboren am 19. März 1925, ist Diplom-Chemiker bei den Bayer-Werken in Krefeld-Uerdingen. Meine beiden Schwestern Barbara und Susanne wurden 1950 und 1965 geboren.

Ich besuchte von 1962 bis 1966 die Grundschule am Tierpark in Krefeld, danach bis 1974 das Uerdinger neusprachliche Mädchengymnasium, wo ich auch das Abitur ablegte.

Anschließend - zum Wintersemester 1974 - begann ich das Medizinstudium an der Universität Düsseldorf. Im Sommer 1976 bestand ich in Düsseldorf die ärztliche Vorprüfung, ein Jahr später den ersten Teil des ärztlichen Staatsexamens und im Frühjahr 1980 den zweiten Teil des ärztlichen Staatsexamens.

Ich beendete mein Medizinstudium im Herbst 1982 mit dem dritten Teil des ärztlichen Staatsexamens, das ich ebenfalls in Düsseldorf ablegte.